

Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einbau und Quantifizierung modifizierter Sialinsäuren in
humane Glykoproteine

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Verena Böhrsch

aus Stuttgart

Datum der Promotion: 14. 02. 2014

Inhalt

Abstract	3
Zusammenfassung	3
Eidesstattliche Versicherung	4
Anteilerklärung (ausführlich)	5
Liste der Top-Journals	6
Publikation	7
Curriculum Vitae	26
Wissenschaftliche Aktivitäten	27
Publikationen	27
Vorträge	28
Publizierte Konferenzbeiträge	28
Danksagung	29

Abstract

Sialylation of glycoproteins and glycolipids on eukaryotic cell surfaces plays an important role during development, regeneration and in the pathogenesis of diseases. The *in vitro* and *in vivo* modification of sialic acids in glycoproteins has therefore become a powerful tool to study the biology of these sugars. A biosynthetic approach to access previously inaccessible C-7 modified sialic acids even in living cells is presented. This was achieved by metabolic incorporation of synthetically derived *N*-acetyl-4-azido-4-deoxy-mannosamine (4-azido-ManNAc) into glycans of mammalian cells, thereby preserving the bioorthogonal functionality of its azido group for subsequent labelling with biophysical probes with an otherwise maintained molecule composition. The relative uptake was determined by the selective cleavage of sialic acids from membrane proteins followed by subsequent labelling and analysis by high performance liquid chromatography (HPLC). High incorporation rates could be achieved by the use of cell lines deficient in UDP-GlcNAc-2-epimerase/ManNAc kinase deficient, a key enzyme in sialic acid biosynthesis. Importantly, a strong preference for the selective C-7 modification in sialic acids of O-glycosylated proteins was found.

Zusammenfassung

Die Sialylierung von Glykoproteinen und Glykolipiden auf der Zelloberfläche von Eukaryoten spielt in Entwicklung und Regeneration sowie in der Pathogenese von Krankheiten eine wichtige Rolle. Die *in vitro* und die *in vivo* Modifikation von Sialinsäuregruppen in Glykoproteinen hat sich daher als potentes Werkzeug zur Untersuchung der Biologie dieser Zucker erwiesen. Ein biosynthetischer Ansatz zur Darstellung vorher nicht zugänglicher C-7-modifizierter Sialinsäuren auch in lebenden Zellen wird präsentiert. Dies wurde durch den metabolischen Einbau von synthetischem *N*-acetyl-4-azido-4-deoxy-mannosamin (4-azido-ManNAc) in Glykane von Säugerzellen erreicht. Dabei blieb die bioorthogonale Reaktivität der Azido-Gruppe für anschließende Markierungsreaktionen bei ansonsten unveränderter Molekülstruktur erhalten. Die relative Einbaurrate wurde durch selektive Abspaltung der Sialinsäuren aus Membranproteinen mit anschließender Markierung und Analyse via Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) bestimmt. Hohe Einbauraten konnten mit Zelllinien erhalten werden, die im Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese, der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase defizient waren. Insbesondere wurde eine starke Präferenz der selektiven C-7-Modifizierung von Sialinsäuren in O-glykosylierten Proteinen gefunden.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Verena Böhrsch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Einbau und Quantifizierung modifizierter Sialinsäuren in humane Glykoproteine selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Verena Böhrsch hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation (Eigenfactor 5.3; Impact factor 13.45) : 40 %

Glycan-Specific Metabolic Oligosaccharide Engineering of C7-Substituted Sialic Acids
H. Möller*, V. Böhrsch*, J. Bentrop, J. Bender, S. Hinderlich, C. P. R. Hackenberger,
Angew. Chemie 2012, 124, 6088-6092, *Angew. Chemie Int. Ed.* 2012 51, 5986-90

*Gleichwertiger Beitrag

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Anteilerklärung (ausführlich)

Glycan-Specific Metabolic Oligosaccharide Engineering of C7-Substituted Sialic Acids H. Möller*, V. Böhrsch*, J. Bentrop, J. Bender, S. Hinderlich, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6088-6092, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012** *51*, 5986-90

*gleichwertiger Beitrag

Heinz Möller und Verena Böhrsch trugen zu je 40 % zur vorliegenden Publikation bei, die weiteren Coautoren zu je ca. 5 %;

Die Beiträge von Verena Böhrsch beinhalteten im wesentlichen die synthetische Präparation der eingesetzten Mannosamin-Metaboliten (~15%), die Quantifizierung der zellulären Sialinsäuren inklusive chemoenzymatischer Darstellung der Standards, die Präparation von Zellmembranen mit selektiver Sialinsäurespaltung und fluoreszenzbasierter HPLC-Analyse (~18%), sowie anteilig Proteinanalytik (SDS-PAGE, Western-Blot) und Zellkultur (5 %); dazu gehörte die Etablierung der Methoden im Labor, die Adaptation an das Projekt und die selbstständige Durchführung der Experimente und Dokumentation der Ergebnisse. Des Weiteren war Verena Böhrsch in die Erstellung des Manuskriptes involviert (2 %).

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Liste der Top-Journals

Einordnung der Publikation unter den „Top-Journals“ nach Impact-Faktor:

ISI Web of Knowledge™

Journal Citation Reports®

WELCOME HELP 2011 JCR Science Edition

Journal Summary List Journals from: subject categories CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY VIEW CATEGORY SUMMARY LIST Journal Title Changes

Sorted by: Impact Factor SORT AGAIN

Journals 1 - 20 (of 154) Page 1 of 8

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data ^(j)						Eigenfactor® Metrics ^(j)	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor® Score	Article Influence® Score
<input type="checkbox"/>	1	CHEM REV	0009-2665	103702	40.197	42.054	7.158	196	7.9	0.21470	13.333
<input type="checkbox"/>	2	CHEM SOC REV	0306-0012	35918	28.760	28.098	5.471	314	3.2	0.13678	8.089
<input type="checkbox"/>	3	ACCOUNTS CHEM RES	0001-4842	39664	21.640	22.507	3.460	126	7.0	0.10120	7.299
<input type="checkbox"/>	4	NAT CHEM	1755-4330	5260	20.524	20.533	5.308	120	1.8	0.03284	7.957
<input type="checkbox"/>	5	NANO TODAY	1748-0132	2170	15.355	16.078	2.324	37	2.8	0.01213	5.167
<input type="checkbox"/>	6	ADV MATER	0935-9648	79860	13.877	12.813	2.155	789	5.0	0.26241	4.071
<input type="checkbox"/>	7	ANGEW CHEM INT EDIT	1433-7851	209862	13.455	13.195	2.898	2002	5.4	0.51421	3.378
<input type="checkbox"/>	8	NANO LETT	1530-6984	75287	13.198	13.843	2.082	955	4.2	0.34591	5.070
<input type="checkbox"/>	9	ACS NANO	1936-0851	22409	11.421	11.708	1.631	1141	2.0	0.12083	3.767
<input type="checkbox"/>	10	ADV FUNCT MATER	1616-301X	28503	10.179	9.920	1.514	533	4.0	0.11269	2.945
<input type="checkbox"/>	11	J AM CHEM SOC	0002-7863	408307	9.907	9.766	1.865	3176	7.5	0.81730	2.799
<input type="checkbox"/>	12	ENERG ENVIRON SCI	1754-5692	5087	9.610	10.813	2.049	548	1.9	0.01802	2.700
<input type="checkbox"/>	13	SMALL	1613-6810	15181	8.349	8.262	1.221	430	3.2	0.07237	2.513
<input type="checkbox"/>	14	CHEM SCI	2041-6520	1697	7.525	7.545	2.848	328	0.9	0.00452	2.492
<input type="checkbox"/>	15	CHEMSUSCHEM	1864-5631	3040	6.827	7.171	1.114	201	2.4	0.01339	1.867
<input type="checkbox"/>	16	TOP CURR CHEM	0340-1022	4942	6.568	5.842	5.500	14	7.2	0.00783	1.730
<input type="checkbox"/>	17	J CONTROL RELEASE	0168-3659	26071	6.499	7.529	0.915	331	6.7	0.04643	1.748
<input type="checkbox"/>	18	GREEN CHEM	1463-9262	12023	6.320	6.761	1.090	442	4.2	0.03185	1.500
<input type="checkbox"/>	19	CHEM COMMUN	1359-7345	105562	6.169	6.082	1.503	3408	5.5	0.24100	1.552
<input type="checkbox"/>	20	CHEM-EUR J	0947-6539	54127	5.925	5.866	1.294	1697	3.9	0.16908	1.532

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Journals 1 - 20 (of 154) Page 1 of 8

Acceptable Use Policy
Copyright © 2013 Thomson Reuters.

THOMSON REUTERS
Published by Thomson Reuters

DOI: 10.1002/anie.201108809

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Wissenschaftliche Aktivitäten

Publikationen

- 13 Chemoselective Staudinger-Phosphite Reaction of Symmetrical Glycosyl-Phosphites with Azido-Peptides and Polyglycerols, V. Böhrsch, T. Mathew, M. Zieringer, M.R.J. Vallée, L.M. Artner, J. Dervede, R. Haag, C.P.R. Hackenberger, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6211-6
- 12 Glycan-Specific Metabolic Oligosaccharide Engineering of C7-Substituted Sialic Acids, H. Möller,* V. Böhrsch,* J. Bentrop, J. Bender, S. Hinderlich, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chemie* **2012**, *124*, 6088-6092, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012** *51*, 5986-90 (*equal contribution)
- 11 N-azidoacetylmannosamine and N-azidoacetylgalactosamine incorporation into N-glycans of recombinantly expressed human lactotransferrin by metabolic oligosaccharide engineering, H. Möller, V. Böhrsch, C. P. R. Hackenberger, S. Hinderlich, *J. Carbohydrate Chemistry* **2011**, *4-6*, 334-346
- 10 Efficient metabolic oligosaccharide engineering of glycoproteins by UDP-N-glucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) knock-down, H. Möller, V. Böhrsch, L. Lucka, C. P. R. Hackenberger, S. Hinderlich, *Mol. BioSyst.* **2011**, *7*, 2245-2251
- 9 Site specific modification of proteins by the Staudinger-phosphite reaction
P. Majkut, V. Böhrsch, R. Serwa, M. Gerrits, C. P. R. Hackenberger, *Methods in Molecular Biology* **2012**, *Vol. 794*, *unnatural amino acids*
- 8 Site-specific functionalisation of proteins by a Staudinger-type reaction using unsymmetrical phosphites, V. Böhrsch, R. Serwa, P. Majkut, et al. *Chem. Commun.* 2010, *46*, 3176-3178
- 7 Suzuki-Miyaura Couplings on Proteins: A Simple and Ready-to-use Catalytic System in Water, *Highlight*, V. Böhrsch, C. P. R. Hackenberger *ChemCatChem* **2010**, *2*, 243-245
- 6 Chemical Biology. Learning through Case Studies. Herausgegeben von Herbert Waldmann und Petra Janning. M. Mühlberg, V. Böhrsch, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8321
- 5 A concise synthesis of (-)-centrolobine via a diastereoselective ring rearrangement/isomerisation sequence, V. Böhrsch, S. Blechert, *Chem. Commun.* **2006**, *118*, 1968
- 4 Die diastereoselektive Ringumlagerungsmetathese, V. Böhrsch, J. Neidhöfer, S. Blechert, *Angew. Chem.*, **2006**, *118*, 1324-1327, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1302-1305

- 3 The Gas Phase Chemistry of *cis*-Diammineplatinum(II) Complexes: A Joint Experimental and Theoretical Study, A. Springer, C. Bürgel, V. Böhrsch, R. Mitrić, V. Bonačić-Koutecký, M. Linscheid, *ChemPhysChem* **2006**, 7(8), 1779
- 2 Der Nobelpreis 2005 (Chemie), V. Böhrsch, S. Blechert, *Naturwissenschaftliche Rundschau*, Dez. 06/2005
- 1 Die Metathese - Partnertausch in Molekülen, Nobelpreis 2005, V. Böhrsch, S. Blechert, *Chem. Unserer Zeit*, **2005**, 39, 379

Vorträge

- School of Chemistry, University of Bradford, spring seminar series 17. 02.2012: *Metabolic Oligosaccharide Engineering for the incorporation of new, modified sialo glycoproteins*
- Symposium für Nachwuchswissenschaftler bioorganische Chemie, Göttingen, 28. 9. 2010 und
- European student conference, Berlin, 14. 10. 2010: *Enhanced Incorporation of Unnatural Sialic Acid Precursors into Glycans of GNE - Deficient Cell Lines*
- internat. Graduiertenkolleg Freiburg, März 2006: *The diastereoselective ring rearrangement metathesis and its application to natural product synthesis*
- Graduiertenkolleg 352, April 2004: *Immobilisation of polymer bound catalysts*

Publizierte Konferenzbeiträge

- Incorporation of ManNAc analogues into sialic acids depending on UDP-GlcNAc-2-epimerase/ManNAc kinase (GNE) expression - a semiquantitative study, V. Böhrsch, H. Möller, C. P. R. Hackenberger, S. Hinderlich, *Eur. J. Med. Research*, **2010**, 15, supplement I, conference abstract, 10
- Impact of UDP-GlcNAc 2-Epimerase/Mannac Kinase (GNE) Expression on Incorporation of ManNAc Analogues Into Sialic Acids, H. Möller, V. Böhrsch, S. Hinderlich, *Glycobiology* **2009**, 19, 1305-1305 Meeting Abstract: 62

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Stephan Hinderlich und Prof. Christian P. R. Hackenberger für die interessante Projektstellung und die Möglichkeit, neben dem Medizinstudium in einem neuen Fachgebiet wissenschaftlich tätig zu sein, besonders auch für das Vertrauen, dass mir dabei entgegengebracht wurde.

Insbesondere Stephan konnte mir sogar telefonisch meine biologischen Fragen auf den Punkt beantworten.

Beiden Arbeitsgruppen danke ich für die gute Zusammenarbeit. Eine Auflistung würde den Rahmen sprengen, deshalb sei nur insbesondere Ina benannt, die mir an den langen dunklen Abenden im Labor Gesellschaft leistete und viele Kaffeetassen lang die weniger erfolgreichen Experimente diskutierte.

Marion danke ich für die Einführung in die Zellkultur. Meinen Koautoren, allen voran Heinz, danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden für den Glauben an mich, die moralische Unterstützung und die stete Erinnerung, auch mal Pause zu machen.

Last but not least sei PD Dr. Lothar Lucka für die Übernahme der internen Betreuung gedankt.